

AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM SANGUE DE CÃES

CÁRIS M. NUNES¹, ANA KARINA K. DIAS², FERNANDA PATRICIA GOTTARDI¹, HENRIQUE B. DE PAULA¹;
MÁRCIA A.A. DE AZEVEDO³; VALÉRIA M.F. DE LIMA⁴, JOSÉ FERNANDO GARCIA¹

ABSTRACT:- NUNES, C.M.; DIAS, A.K.K.; GOTTARDI, F.P.; PAULA, H.B. DE; AZEVEDO, M.A.A DE; LIMA, V.M.F. DE; GARCIA, J.F. [Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples]. Avaliação da reação em cadeia pela polimerase para diagnóstico da leishmaniose visceral em sangue de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 1, p. 5-9, 2007. Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 93, Jardim D, Amélia, Araçatuba, SP 16050-680. E-mail: caris@fmva.unesp.br

Canine and human visceral leishmaniasis is endemic in several States of Brazil, and it is associated with infected dogs and the presence of the vector. Aiming at using polymerase chain reaction as a diagnostic tool in dogs, we amplified a 120bp fragment from kDNA of *Leishmania* spp. by PCR in blood samples. The lower detection limit observed was 0.1 parasites per 500µL of blood, which is a highly satisfactory result. On the other hand, PCR evaluation in 166 blood samples of dogs from Poxoréu, MS, Brazil, resulted in 55% sensitivity and 66.3% specificity, considering indirect immunofluorescent test as gold standard.

KEY WORDS: Canine visceral leishmaniasis, diagnosis, deoxyribonucleic acid (DNA), polymerase chain reaction (PCR), dog.

RESUMO

As formas canina e humana da leishmaniose visceral ocorrem endemicamente em vários Estados do Brasil, havendo associação entre cães infectados e presença do vetor. Com o intuito de utilizar a PCR para o diagnóstico em cães, procedeu-se à amplificação, por PCR, de fragmento de 120pb de kDNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue periférico de cães. O limiar de detecção da reação em cadeia pela polimerase revelou amplificação de kDNA referente a 0,1 parasita/500µL de sangue periférico. Os resultados de validação da PCR em 166 amostras de cães do município de Poxoréu-MS revelaram sensibilidade de 55% e especificidade 66,3%, considerando-se a reação de imunofluorescência indireta como padrão.

¹ Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Araçatuba, Rua Clóvis Pestana 93, Jardim D, Amélia, Araçatuba, SP 16050-680. E-mail: caris@fmva.unesp.br

² Instituto de Biociências, UNESP, Campus Botucatu, SP.

³ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, UNESP, Campus Botucatu, SP.

⁴ Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, UNESP, Campus Araçatuba, SP.

PALAVRAS-CHAVE: Leishmaniose visceral canina, Diagnóstico, Ácido desoxirribonucléico (DNA), Reação em cadeia pela polimerase (PCR), cão.

INTRODUÇÃO

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasita que infecta numerosos mamíferos, incluindo o homem. São transmitidas pela picada de flebotômios e dentre as 15 espécies de *Leishmania* que infectam o homem, 13 tem natureza zoonótica causando a forma visceral, cutânea ou mucocutânea (GRAMICCIA; GRADONI, 2005).

No Brasil, as formas canina e humana da leishmaniose visceral (LV) ocorrem endemicamente em vários Estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste e em todos os Estados há associação entre cães infectados e presença do vetor (MILES et al., 1999). O baixo padrão de vida da população, a maior densidade dos flebotômios e a presença de cães infectados são fatores predisponentes para implantação desta zoonose (ALENCAR, 1983; BADARÓ et al., 1986; NASCIMENTO, 1996).

As principais medidas de controle da LV no Brasil es-

tão baseadas na interrupção do ciclo de transmissão e envolvem o diagnóstico e tratamento de casos humanos, o controle vetorial através do uso de inseticidas e a triagem sorológica com posterior eutanásia de cães positivos para leishmaniose (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; BRASIL, 2003). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) tem sido mais freqüentemente utilizada na população canina (COSTA; VIEIRA, 2001). Mais recentemente, o diagnóstico molecular baseado na amplificação de fragmento de DNA através da reação em cadeia pela polimerase (PCR) tem sido desenvolvido por diversos autores (RODGERS, et al., 1990; REALE et al., 1999; FISA et al., 2001; QUINNELL et al., 2001; SILVA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MANNA et al., 2004), resultando em maior rapidez de execução.

Rodgers et al. (1990), assim como outros autores, basearam-se na amplificação de fragmento da região conservada do minicírculo de kinetoplastos (kDNA) por estes estarem presentes em 10.000-20.000 cópias e por ser a amplificação da região conservada 10 vezes mais sensível que a da região variável.

A amplificação de fragmentos de DNA de *Leishmania* pela PCR tem sido realizada a partir de diferentes tecidos bem como de aspirado de linfonodos, medula óssea e de leucócitos de sangue periférico (IKONOMOPOULOS et al., 2003). O uso de sangue periférico apresenta a vantagem de ser um processo de coleta fácil, menos invasivo, mas que pode resultar em menor sensibilidade do teste devido à baixa parasitemia dos animais infectados (FISA et al., 2001).

Objetivou-se avaliar a PCR para amplificação de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue periférico de cães, com o intuito de utilizá-la como instrumento diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) em área endêmica. Além de questões logísticas, optou-se pela região de Poxoréu-MT por ter registrado anteriormente casos humanos de leishmaniose visceral. As medidas aplicadas no município para o controle desta enfermidade têm sido a identificação e tratamento de casos humanos, a identificação e eutanásia de cães soropositivos e o controle vetorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação do limiar de detecção da PCR. Amostras de sangue periférico de 2 cães, sem raça definida, provenientes de área não endêmica para LVC (Diadema-SP) e negativos para anticorpos anti-*Leishmania* spp. pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foram utilizadas para a contaminação artificial das amostras, em duplicata, com diluições seriadas, na base 10, de formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*.) *chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), em fase exponencial de crescimento, mantidas em meio de cultura (LIT). A extração de DNA foi realizada após digestão com proteinase K (0,5µg), extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol (SAMBROOK et al., 1989).

Coleta de sangue total e avaliação sorológica dos cães. No período de setembro a novembro de 2002 foram colhidas amostras de sangue de cães sem raça definida, com idade variada, dos diferentes setores do município de Poxoréu-MS (15°24'00"Sul e 54°18'15"W), após consentimento esclarecido dos proprietários. As amostras de sangue total foram colhidas com citrato de sódio 62,5mM/ácido cítrico 20,8mM e conservadas a -20°C, até o processamento. A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro foi avaliada através da RIFI realizada pelo Laboratório Central do Estado do Mato Grosso (LACEN), segundo Camargo e Rebonato (1969). A diluição discriminante do soro foi de 1/40. Oitenta amostras de cães considerados positivos ao teste de RIFI e 86 amostras de cães negativos oriundos dos mesmos setores das amostras positivas, foram avaliadas quanto à presença de DNA de *Leishmania* spp., através da PCR.

Extração e amplificação de DNA. O DNA foi extraído de 500µl de sangue periférico de cão, conservados a -20°C, utilizando-se o kit GFX genomic blood kit® (Amersham Biotech, Piscataway, New Jersey, USA) para um volume final de 100µl.

A amplificação de DNA de minicírculos de kinetoplastos de *Leishmania* spp. foi realizada pela PCR utilizando-se os primers 13A (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT -3') e 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3') descritos por Rodgers et al. (1990). As reações foram realizadas em duplicata, contendo 5µl de tampão de reação 10x (Invitrogen®, Carlsbad, California), 1,25 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,5mM MgCl₂, 0,2µM de cada primer, 2U de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Carlsbad, California) e 5µl de DNA em um volume final de 50µl. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador (MJ Research Thermal cycler) com denaturação inicial a 95°C por 5 minutos, sendo seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para denaturação, 63°C por 45 segundos para associação, 72°C por 30 segundos para extensão e 72°C por 5 minutos para extensão final. A verificação da amplificação dos fragmentos de DNA de 120 pb foi feita com 10µl do produto de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata.

RESULTADOS

A avaliação do limiar de detecção da PCR revelou ser possível a amplificação de fragmento de DNA (120bp) em amostra de sangue artificialmente contaminada com até 10⁻¹ formas promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *chagasi* (Figura 1).

A Figura 2 ilustra alguns dos resultados observados, por PCR, em amostras de sangue de cães do município de Poxoréu-MT, com diagnóstico sorológico (RIFI) positivo e negativo para *Leishmania* spp.

Adotando-se a RIFI como método diagnóstico padrão, a avaliação da PCR, segundo Guimarães (1985) revelou sensibilidade relativa de 55%, especificidade relativa de 66,3% e concordância de 60,8% (Tabela 1). O coeficiente de concordância Kappa (ZAR, 1998) foi calculado em 0,2134.

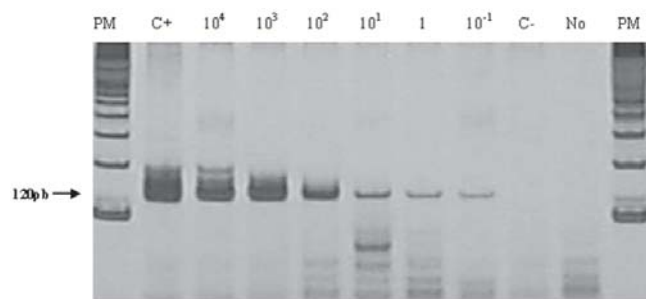


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Amplificação de fragmento de DNA de 110.000 formas promastigotas de *Leishmania chagasi* diluídas na base 10. (C+)110.000 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (C-) DNA de cão negativo e (No) sem DNA. PM = marcador em escada de 100pb (Invitrogen®).



Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Amplificação de fragmento de DNA (a) Controle Positivo contendo 10^4 formas promastigotas de *Leishmania chagasi*; (b-o) de sangue periférico de cães oriundos de Poxoréo-MS; (p) de sangue periférico de cão naturalmente infectado com *Leishmania* spp. de área endêmica (q) de sangue periférico de cão de área não endêmica; (No) sem DNA. PM = marcador em escada de 100pb (Invitrogen®).

Tabela 1. Número de amostras de sangue de cães estudadas segundo o resultado da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para leishmaniose e reação em cadeia pela polimerase (PCR).

PCR	RIFI		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	44	29	73
Negativo	36	57	93
Total	80	86	166

DISCUSSÃO

No presente estudo, objetivou-se avaliar a PCR em amostras de sangue circulante de cães, para amplificação de fragmento de 120pb de kDNA de *Leishmania* spp. Embora amostras de aspirado de linfonodo (REALE et al., 1999) e de pele (MANNA et al., 2004) tenham sido reportados como amostras clínicas melhores que sangue circulante para amplificação de kDNA de *Leishmania* spp. em cães, optou-se por utilizar amostras de sangue por ser de colheita mais fácil e menos invasivo, particularmente quando se avalia grande número de animais.

A PCR descrita revelou amplificação de kDNA referente a 0,1 parasita/500µl de sangue circulante, resultado este considerado melhor que o observado por Reale et al. (1999) que, utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores em amos-

tras de sangue artificialmente contaminadas com DNA de *Leishmania infantum*, observaram limiar de 1 parasita/500µl de sangue, após PCR e hibridização com sonda de 70pb. Já Lachaud et al. (2002), avaliando seis métodos de PCR, referem-se a limiar de 10^{-3} parasitas/ml de sangue periférico, após amplificação de kDNA por PCR semelhante à descrita no presente artigo. O melhor limiar de detecção da PCR a partir de DNA de kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* pode ser explicado pelo grande número de cópias de minicírculos de kinetoplasto presentes no parasita (REALE et al., 1999, LACHAUD et al., 2002). A avaliação do limiar de detecção, ainda que teórico, uma vez que pelo menos um parasita precisa estar presente na amostra (LACHAUD et al., 2002), é um dos indicadores da performance do teste, considerada boa no presente estudo.

Quando a PCR foi avaliada em amostras de cães colhidas a campo em área endêmica (Poxoréo-MT), os resultados revelaram baixa sensibilidade (55%) e especificidade (66,3%) e fraca concordância ($\kappa = 0,2134$), segundo os critérios de Landis e Koch (1977), quando comparadas a imunofluorescência indireta. Ikononopoulos et al. (2003) avaliaram a PCR com oligonucleotídeos iniciadores diferentes dos utilizados no presente trabalho, em 160 amostras de sangue de cães de Atenas, Grécia, e observaram valores maiores de sensibilidade (87,8%) e de especificidade (95,3%) comparando-se com os resultados da RIFI. Manna et al. (2004) avaliaram 95 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, na Itália, e observaram alta positividade (94%) na PCR realizada com os mesmos iniciadores utilizados no presente estudo em amostras de sangue de cães.

De modo geral, há grande variação na sensibilidade do método de PCR particularmente no que se refere ao método de extração de DNA utilizado, da escolha dos oligonucleotídeos iniciadores, das amostras clínicas utilizadas bem como do tempo de infecção (QUINNELL et al., 2001; LACHAUD et al., 2002; IKONOMOPOULOS et al., 2003; MANNA et al., 2004). No presente trabalho, os oligonucleotídeos escolhidos amplificam um fragmento de minicírculos de DNA de kinetoplasto que resultou em melhor limiar de detecção porém, a qualidade das amostras clínicas pode influenciar os resultados de sensibilidade e especificidade observados na PCR, uma vez que as colheitas de sangue total foram realizadas por agentes de saúde que não estavam acostumados a homogeneizar as amostras, resultando em amostras com presença de coágulos que dificultaram a extração do DNA alvo. Outro fator que pode colaborar para a baixa sensibilidade da PCR em amostras de sangue é o grau de parasitemia dos animais infectados, conforme já citado por Fisa et al. (2001). Por questões logísticas, os animais do presente trabalho não puderam ser avaliados parasitologicamente dificultando a análise dos resultados observados na RIFI.

A associação da hibridização com sonda de DNA radioativamente marcada pode favorecer o desempenho da PCR, conforme observação de Reale et al. (1999) e Silva et al.

(2001). Estes autores observaram 85% e 100% de sensibilidade e 80% e 95,2% de especificidade, respectivamente. Por outro lado, a hibridização é um procedimento mais demorado, que oferece riscos ao operador, além da necessidade de adequações físicas para o desenvolvimento desta metodologia, o que justifica a diminuição de sua aplicação mais recentemente. Outro procedimento que pode favorecer os resultados da PCR é a realização do “nested-PCR” utilizado por Fisa et al. (2001) em amostras de sangue de cães, o qual não foi avaliado no presente estudo.

Nas condições estudadas, a PCR não se revelou em boa ferramenta para triagem diagnóstica em populações devido à baixa sensibilidade e especificidade, quando comparada à RIFI. Em áreas endêmicas, os testes sorológicos ainda apresentam como vantagem a maior facilidade de execução e o custo mais baixo. A PCR pode ser de grande valia no diagnóstico individual e para o acompanhamento de cães vacinados, medida recentemente adotada por alguns clínicos veterinários no Brasil e não recomendada pelo Ministério da Saúde como medida de controle da leishmaniose visceral.

Agradecimentos. Ao Laboratório Central do Estado do Mato Grosso (LACEN) pela realização dos exames de RIFI; ao Coordenador e Agentes de Saúde da FUNASA de Poxoréu-MT pelo apoio na colheita das amostras; ao Pedro Luiz Florindo pelo auxílio na manutenção do LBBMA-DAPSA-FOA-UNESP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, J.E. Expansão do calazar no Brasil. *Ceará Médica*, v. 5, n. 4, p. 86-102, 1983.
- BADARÓ, R.; JONES, T.C.; LORENÇO, R.; CERF, B.J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E.M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr., W.D. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 154, n. 4, p. 639-649, 1986.
- BRASIL, *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*, 2003. Brasília: Ministério da Saúde, 122p.
- CAMARGO, M.E., REBONATO, C. Cross reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 18, n. 4, p. 500-505, 1969.
- COSTA, C.H.N.; VIEIRA, J.B.F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, p. 223-228, 2001.
- FISA, R.; RIEIRA, C.; GÁLLEGO, M.; MANUBENS, J.; PORTUS, M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Veterinary Parasitology*, v. 99, n. 2, p. 105-111, 2001.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.
- GUIMARÃES, M.C. Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 18, n. 2, p. 117-120, 1985.
- IKONOMOPOULOS, J.; KOKOTAS, S.; GAZOULI, M.; ZAVRAS, A.; STOITSIOU, M.; GORGOLIS, V.G. Molecular diagnosis of leishmaniasis in dogs: comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*, v. 113, n. 2, p. 99-113, 2003.
- LACHAUD, L.; MARGCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DREREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
- MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L.M.; MORTE, R.D.; CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A.E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 125, n. 3-4, p. 251-262, 2004.
- MILES, M.A.; VEXENAT, J.A.; FURTADO CAMPOS, J.H.; FONSECA DE CASTRO, J.A. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 1999. Barcelona. *Proceedings...* Barcelona: Killick-Kendrick, 1999. p. 46-53.
- NASCIMENTO, M.D.S.B. *Epidemiologia da leishmaniose visceral na Ilha de São Luís, Maranhão-Brasí: análise da dinâmica de transmissão e dos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento da doença*. 1996. 171 f. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, SP, 1996.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J.J.; SHAW, M.A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology*, v. 122, n. 3, p. 253-261, 2001.
- REALE, S.; MAXIA, L.; VITALE, F.; GLOSRIOSOS, N.S.; CARACAPPA, S.; VESCO, G. Detection of *Leishmania infantum* in dogs by PCR with lymph node aspirates and blood. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 9, p. 2931-2935, 1999.

- RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, v.71, n.3, p. 267-275, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. p. E.3-E.4.
- SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PIRMEZ, C.; FERNANDÉS, O. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.65, n.6, p.896-898, 2001.
- ZAR, J.H. *Biostatistical analysis*. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1998. 930 p.

Recebido em 15 de fevereiro de 2006.

Aceito para publicação em 07 de fevereiro de 2007.